Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 577-597

# Characterization of Melon Resistant Cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Based on Morphological Traits and R Gene Patterns

**F. Shokouhifar[1]*, M. Mamarabadi[2], S. Toosi[3]**

1 and 2- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: shokouhifar@um.ac.ir)
3- Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashahad, Iran

Received: 27-01-2024
Revised: 19-05-2024
Accepted: 16-06-2024
Available Online: 18-06-2024

**How to cite this article:**
Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Toosi, S. (2024). Characterization of melon resistant cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* based on morphological traits and R gene patterns. *Journal of Horticultural Science, 38*(3), 577-597. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86574.1324

## Introduction

Melon (*Cucumis melo* L.) is a diploid plant with (2n = 2x = 24) chromosomes, dicotyledonous and annual, which has been receiving lots of attention for its biological characteristics and economic value for a long time. Iran with production of about 1.6 million tons per year ranks third in melon production in the world after China and Turkey. Vascular wilt caused by the soil borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* is one of the most important diseases causing damage to the melon plant. Due to the survival of this fungus in the form of chlamydospores in the soil and plant debris its control has been a difficult challenge so that, the only way to deal with this disease is to use resistant cultivars. The present study was conducted to characterize morphologically different melon cultivars with varying levels of resistance against Fusarium vascular wilt. Furthermore, the presence pattern of two MRGH genes belonging to the MRGH21 linkage group was tracked in the genome of the melon line, and their variations were defined. Moreover, the potential for using these genes in gene-assisted selection was investigated.

## Materials and Methods

Five different varieties of melon named Charentais T, Charentais Fom1, Charentais Fom2, BG-5384 and the local cultivar Khatouni were grown under greenhouse conditions. Different characteristics of the plant, including leaf shape, male flowers, female flowers and normal flowers, and after harvesting the fruits, fruit weight, fruit diameter and length, diameter of flesh and middle cavity. The differentiation of resistant and sensitive cultivars was investigated based on the evaluated morphological traits. Additionally, the presence patterns of resistance genes were examined in the genomic data of the aforementioned melon cultivars. The genomic analysis of melons aimed to locate the MRGH21 linkage group, which carries several resistance genes. The sequence of this linkage group was tracked from two gene bank databases in NCBI and MELONOMICS database.

## Results

Based on the obtained results, although it was possible to differentiate melon cultivars based on morphological traits, but since the study of these traits in the evaluation of a large number of samples in selective studies is a very time-consuming and costly task. Therefore, the presence pattern of resistance genes were analyzed in the genomic data of different melon cultivars. The sequence between two genes *MRGH12* and *MRGH13* including *MRGH21* linkage group as one of the linkage groups carrying a number of resistance genes on Ch09 chromosome was retrieved form two gene bank databases in NCBI and MELONOMICS. Due to the presence of multiple point mutations in the genomic data, the MRGH13 gene sequence was selected for investigation in melon cultivars. Specific primers, PSh21-F/R, were designed to track part of this gene's sequence. The tracking results showed that a


https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86574.1324

single specific band, corresponding to the expected size, could be detected in the cultivars Charentais Fom1 and BG-5384. Sequence analysis using the InterPro network tool confirmed the possible role of the protein coded by the MRGH13 gene. It was identified as a member of the protein family carrying leucine-rich repeat sequences, including the TIR, NB-ARC, and LRR domains.

## Discussion

Attaining suitable markers to distinguish melon cultivars resistant to Fusarium wilt disease can support the development of breeding programs with higher accuracy and speed. The results of the present study showed that based on the morphological traits such as leaf shape, the presence of full flowers, and the number of petals, some differences can be observed between different melon cultivars, but the noteworthy point is that in selection programs searching for these morphological traits will be a very time-consuming and expensive task due to the large number of investigated samples. Therefore, if molecular markers related to the resistance trait are available, the efficiency of breeding programs is expected to increase significantly. In the present study *MRGH13* gene was selected to be investigated for tracking in melon cultivars and specific primers were designed to track part of the sequence of this gene. The tracking results showed that a single specific band could be detected in the cultivars Charentais Fom1 and BG-5384. Biological processes related to MRGH13 protein in the QuickGO network tool showed its relevance in the signaling pathway that regulates immune responses. In future studies, it is suggested to evaluate the ability to distinguish resistant cultivars based on resistance genes, including the *MRGH13* gene, in a larger number of samples. Moreover, considering to the predicted functions of MRGH13 protein, more investigation on its interaction with other resistance proteins as well as proteins of pathogenic agents can be useful for identification of its functional role in resistance.

**Keywords:** Fusarium wilt disease of melon, Marker assisted selection, Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS–LRR) Genes, Plant disease resistance genes

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱٤۰۳، ص. ۵۷۷-۵۹۷

# تمایز ارقام مقاوم ملون در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* بر اساس صفات ظاهری و الگوی حضور ژن‌های مقاومت

فرهاد شکوهی فر[۱]* - مجتبی ممرآبادی[۲] - صهبا طوسی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

## چکیده

دست‌یابی به نشانگرهای مرتبط به صفت مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی ملون می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی مؤثر باشد. بدین منظور تعدادی از ارقام استاندارد ملون شامل 'Charentais T'، 'Charentais Fom1'، 'Charentais Fom2' و 'BG-5384' با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*، و یک رقم محلی به نام'خاتونی'، از نظر صفات ظاهری گیاه و همچنین الگوی حضور ژن‌های مقاومت در برابر بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده هر چند امکان تمایز ارقام بر اساس صفات ظاهری ممکن بود ولی از آنجا که مطالعه این صفات در ارزیابی تعداد زیاد نمونه‌ها در مطالعات گزینشی کاری بسیار زمان‌بر و هزینه‌بر است، الگوی حضور ژن های مقاومت در داده‌های ژنومی این ارقام مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای داده‌های ژنومی ملون با هدف مکان‌یابی موقعیت گروه لینکاژی *MRGH21* به‌عنوان یکی از گروه‌های لینکاژی حامل تعدادی از ژن‌های مقاومت انجام شد. توالی این گروه لینکاژی از دو پایگاه بانک ژن در NCBI و پایگاه MELONOMICS ردیابی شد و توالی حدفاصل دو ژن *MRGH12* (MELO3C022143.2.1) و *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) در برگیرنده این گروه لینکاژی روی کروموزوم شماره Ch09 استحصال شد. وجود جهش‌های نقطه‌ای متعدد در داده های ژنومی سبب شد تا توالی ژن *MRGH13* جهت ردیابی در ارقام ملون مورد بررسی قرار گیرد. آغازگرهای اختصاصی PSh21-F/R برای ردیابی بخشی از توالی این ژن طراحی شد. نتایج ردیابی نشان داد تک باند اختصاصی در ارقام 'Charentais Fom1' و 'BG-5384' منطبق با اندازه مورد انتظار قابل ردیابی است. نقش احتمالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* با آنالیز توالی آن در ابزار تحت شبکه InterPro این پروتئین را به عنوان یک عضو خانواده پروتئین‌های حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین تایید نمود و موقعیت دمین‌های TIR، NB-ARC و LRR را مشخص نمود. فرآیندهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13 در ابزار تحت شبکه QuickGO ارتباط آن را در مسیر پیام‌رسانی تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی نشان داد. در مطالعات آتی ارزیابی قابلیت تمایز ارقام مقاوم براساس ژن‌های مقاومت از جمله ژن *MRGH13* در تعداد بیشتری از نمونه‌ها مورد بررسی پیشنهاد می‌گردد. همچنین با توجه به کارکردهای پیش‌بینی‌شده برای پروتئین MRGH13 بررسی نحوه برهمکنش آن با دیگر پروتئین‌های مقاومت و همچنین پروتئین‌های عوامل بیماری‌زا می‌تواند در شناسایی نقش کارکردی آن در مقاومت مفید باشد.

**واژه‌های کلیدی** بیماری پژمردگی فوزاریومی ملون، ژن‌های مقاومت حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین، داده‌های ژنومی ملون، گزینش مبتنی بر صفات مرتبط با مقاومت

## مقدمه

ملون (*Cucumis melo* L.) گیاهی دیپلویید با (2n = 2x = 24) کروموزوم، دولپه و یکساله می‌باشد که به خاطر ویژگی‌های بیولوژیکی و ارزش اقتصادی از دیرباز مورد توجه قرار گرفته است. خاستگاه این گیاه به احتمال زیاد شرق آفریقا بوده است ولی برخی خاستگاه این گیاه را آسیا می‌دانند (Pitrat, 2008). گیاه ملون به همراه گیاهانی چون خیار، هندوانه و کدو متعلق به خانواده کدوییان یا Cucurbitaceae می‌باشد (Garcia-Mas *et al.*, 2012). این

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: shokouhifar@um.ac.ir)
۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86574.1324

گیاهان دارای بتا کاروتن بالا، ویتامین‌های A و C، پتاسیم، آب فراوان و ارزش گرمایی پایین هستند (Teimouri *et al.*, 2013). بر اساس آمار سازمان فائو تولید جهانی گیاه ملون در سال ۲۰۱۷ حدود ۳۲ میلیون تن بوده که از این میان کشور چین با تولید ۱۷ میلیون تن بیشترین تولید را داشته و پس از آن کشورهای ترکیه با تولید ۱/۸ میلیون تن و ایران با تولید حدود ۱/۶ میلیون تن در رتبه دوم و سوم قرار گرفته‌اند (FAO, 2017).

یکی از بیماری‌های خسارت‌زا به گیاه ملون توسط قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ایجاد می‌شود و سبب پوسیدگی آوندی گیاهچه‌ها می شود. این قارچ اولین بار در سال ۱۹۳۰ در نیویورک گزارش شد (Chupp, 1930) و در حال حاضر در بسیاری از کشورها نیز گزارش شده است (Leary *et* Leach, 1933 ,Quiot *et al.*, 1979; *al.*, 1976). علائم ظاهری بیماری شامل پژمردگی ساقه و اندام‌های هوایی است که در بافت آوندی در منطقه طوقه گیاه خسارت وارد می‌نماید و همچنین سبب تغییر رنگ ریشه‌ها می شود (Chilosi *et al.*, 2008). دامنه تخریب این قارچ در عملکرد و کیفیت گیاه در برخی مطالعات به حدود ۱۰۰ درصد تولید محصول رسیده است (Benoit, 1974). قارچ فوزاریوم در مناطق معتدل و گرمسیری شیوع داشته و برای مدت‌های طولانی به‌صورت کلامیدوسپور در بقایای گیاهی و ریشه گیاهانی که در تناوب با ملون هستند در خاک بقاء می‌یابد (Kantoğlu *et al.*, 2010). بقای این قارچ به‌صورت کلامیدوسپور در خاک و بقایای گیاهی برای مدت‌های طولانی مبارزه با آن را به چالشی سخت بدل کرده است به‌طوری‌که تنها راه مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد (Kantoğlu *et al.*, 2010).

توصیف ارقام ملون با مقایسه صفات کمی و کیفی مورد توجه بوده است (Chikh-Rouhou *et al.*, Ajuru & Okoli, 2013 ,Soltani *et al.*, 2022; Szamosi *et al.*, 2010;2010). از جمله صفات مورد بررسی می توان به مقایسه ویژگی‌های ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر اشاره نمود که در گیاهان بالغ کشت شده در مزرعه ارزیابی شده‌اند (Ajuru & Okoli, 2013). صفات برخی از ارقام منشاء گرفته از توده‌های بومی نیز مورد مطالعه قرار گفته است (Sobhani *et al.*, 2015). بطور معمول تمایز ارقام ملون بر اساس صفات رشدی، زایشی و ویژگی‌های میوه انجام می‌شود که با محدودیت‌های زمانی و محیطی همراه است. استفاده از صفات مورفولوژیکی و مولکولی در تمایز ارقام ملون در چند تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است. در یک مطالعه، ۵۴ رقم ملون با ژنوتیپ‌های مختلف از ۲۳ کشور از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک (مراحل رشد رویشی، گلدهی و میوه رسیده) و ویژگی‌های کیفی (مزه، عطر، ترکیب شکر و pH) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه همچنین با مطالعه چندشکلی DNA با استفاده از روش‌های Inter-SSR-PCR و RAPD، چند شکلی‌های DNA فراوانی در بین ژنوتیپ‌های ملون یافت شد (Stepansky *et al.*, 1999). در تحقیق دیگری، تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در طی رشد، بلوغ و رسیدگی ۷ رقم ملون مورد بررسی قرار گرفت. همچنین رابطه بین تولید $CO_2$ و $C_2H_4$ و دیگر علائم رسیدن مورد مطالعه قرار گرفت (Miccolis & Saltveit, 1991). در یک مطالعه دیگر ۵۸ رقم ملون از نظر ویژگی های مورفولوژیکی ژرم‌پلاسم ملون ترکیه‌ای و مجارستانی را مورد مقایسه قرار داد. نتایج نشان داد که هر دو ژرم‌پلاسم ترکیه‌ای و مجارستانی از نظر خصوصیات مورفولوژیکی تنوع زیادی نشان می دهند. همچنین نتایج حاکی از تفاوت ارقام دو کشور از نظر صفات کمی و کیفی بود (Szamosi *et al.*, 2010). در مطالعه دیگری با استفاده از تعداد هجده SSR یا میکروساتلایت، تنوع ژنتیکی در کلکسیونی از ۲۷ واریته ملون شامل محدوده وسیعی از ارقام وحشی و زراعی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این تحقیق با روش تجزیه کلاستر، ۵ گروه شناسایی شدند. دو گروه عمده شامل ارقام مدیترانه-ای، و ارقامی هم از چین، ژاپن، کره و هند بودند. هر دو گروه سطح کمی از تنوع داخل رقمی را نسبت به گروه‌های دیگر نشان می‌دادند که بیانگر وقوع فرسایشی در تنوع ژنتیکی آنها بود. این امر احتمالا بخاطر رانش یا اصلاح درون گروهی بوده است. گروه‌های دیگر عمدتا از آفریقای مرکزی و هند متنوع‌تر بوده و پیشنهاد شده که به‌عنوان منابع تغییرات ژنتیکی در اصلاح ملون مورد استفاده قرار گیرند (Monforte *et al.*, 2003).

روش‌های گزینش مبتنی بر نشانگرهای مولکولی گزینش منابع مقاومت را بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی و ژنومی ممکن ساخته‌اند (Sudheesh *et al.*, 2021). با توجه به شناسایی ژن‌های مرتبط با بسیاری از صفات ظاهری، گزینش برای انتخاب صفات مناسب با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط مورد توجه قرار گرفته است (Lian *et al.*, 2021). گزارش ژن‌ها و جهش‌های نقطه‌ای کارکردی مرتبط با بیماری‌ها شناسایی و ردیابی آلل‌های مقاومت را در نمونه-های ژرم‌پلاسمی ممکن ساخته‌است (Deokar *et al.*, 2019 ,Udoh *et al.*, 2021;Singh *et al.*, 2023).

در ژنوم ملون بالغ بر چهارصد ژن با ساختاری مشابه با ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها شناسایی شده است (Garcia-Mas *et al.*, 2012). از این میان تعدادی از ژن‌ها، در مقاومت به بیماری فوزاریوم نقش دارند. حضور ژن‌های مقاومت در ارقام مختلف می‌تواند مبنای طبقه‌بندی نژادهای قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* قرار گرفته است. در ارقام ملون دو ژن مقاومت مستقل و غالب (*Fom-1* و *Fom-2*) گزارش شده‌است که ژن *Fom-1* مسئول

مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲؛ و ژن *Fom-2* در برابر نژادهای صفر و ۲ این قارچ مقاومت ایجاد می‌کند (Zink & Thomas, 1990; Zheng & Wolff, 2000). یک ژن منفرد و غالب دیگر به نام *Fom-3* در رقم Perlita-FR گزارش شده است که می‌تواند عامل مقاومت نژادهای صفر و ۲ باشد (Zink, 1985). نژاد صفر، بیماری را تنها در ژنوتیپ‌هایی از ملون ایجاد می‌کند که فاقد هر ژن مقاومت دیگری به این بیماری باشند (Zink & Thomas, 1990). تاکنون ژن‌های مقاومت *Fom-1* (Brotman *et al*., 2013) و *Fom-2* (Joobeur *et al*., 2004) همسانه‌سازی شده‌اند.

هر چند در گزارش‌های اولیه ۷ نژاد در جمعیت این بیمارگر گزارش شده است (Armstrong & Armstrong, 1978) ولی در مطالعات تکمیلی صرفا بر مبنای ژن‌های مقاومت شناسایی شده، جمعیت قارچ فوزاریوم عامل بیماری پژمردگی آوندی ملون در چهار نژاد با نام‌های صفر، ۱، ۲ و ۱/۲ تقسیم بندی شده‌اند (Risser & DW, 1976). در مطالعات بعدی نژاد ۱/۲ به دو زیرنژاد ۱/۲y و ۱/۲w به‌ترتیب با بروز علایم زردی و پژمردگی از یکدیگر تفکیک شدند (Herman & Perl-Treves, 2007). در مطالعات معمولا چهار رقم استاندارد شامل ‘Charentais T’، ‘Charentais Fom1’، ‘Charentais Fom2’ و ‘BG-5384’ با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*، مربوط به دسته کانتالوپنسیس برای تمایز نژادهای مورد استفاده قرار می‌گیرند. رقم فرانسوی ‘Charentais Fom1’ در برابر نژادهای صفر و ۲ قارچ فوزاریوم مقاوم می باشد. ‘Charentais Fom2’ در برابر نژادهای صفر و ۱ مقاوم بوده و به همراه رقم ‘Charentais T’ از کشور فرانسه منشا گرفته است. رقم ‘Charentais T’ به هر سه نژاد صفر، ۱ و ۲ حساس می‌باشد (Chikh-Rouhou, Alvarez *et al*., 2005, Oumouloud *et al*., 2013, *et al*., 2008). هر سه رقم فوق از واریته کانتالوپ ملون اصلاح شده‌اند. رقم پرتغالی ‘BG-5384’ که از واریته کانتالوپ منشاء گرفته سطح نسبتا بالایی از مقاومت را به نژاد ۱/۲ قارچ فوزاریوم نشان داده‌است. همچنین سطوحی از مقاومت به نژادهای کمتر مهاجم همین قارچ در برخی از ارقام منشاء گرفته از واریته Inodorus مشاهده شده است (Chikh-Rouhou *et al*., 2007;2010, Chikh-Rouhou *et al*.,). ژن‌های مقاومت می‌توانند هدف مناسبی برای ردیابی با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی و گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم در نسل‌های تفکیک مورد توجه قرار گیرند (Jiang, 2013). در مطالعه انجام‌شده روی توالی ژن *Fom-2* در ارقام مختلف ملون جهش‌های همنام و غیرهمنام گزارش شده است، ولی این تنوع به‌عنوان یک جهش کارکردی متمایزکننده نتوانسته است روش سریع و ساده‌ای را برای تمایز ژنوتیپ‌های ملون مقاوم و حساس به بیماری فوزاریوم معرفی نماید (Shokouhifar *et al*., 2016). بررسی تعداد گسترده‌تری از ژن‌های مقاومت می‌تواند شانس دست‌یابی به جهش‌های کارکردی را افزایش دهد.

علاوه بر ژن‌های مقاومت شناخته شده در ارقام مقاوم به بیماری فوزاریوم، ژنوم گیاهان دارای تعداد زیادی ژن مقاومت (R genes) برای مقابله با عوامل بیمارگر می‌باشد. عمده این ژن‌های مقاومت به خانواده بزرگی از ژن‌ها (۱۵۰-۶۰۰ عضو) تعلق دارند که پروتئین‌هایی را با یک مکان اتصال نوکلئوتیدی (NBS) و یک دمین تکرار غنی از لوسین (LRR) کد می‌کنند (دسته NBS-LRR) (van Leeuwen *et al*., 2005). همولوگ‌های ژن مقاومت (RGHs) دسته NBS-LRR در ژنوم گیاهان مختلف پیدا شده‌اند. این دسته از ژن‌های مقاومت به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول که در دمین پایانه N آنها یک گیرنده Toll/Interleukin-1 (TIR) وجود دارد و گروه دوم که در این پایانه N آن‌ها یک دمین پیچ در پیچ (CC) قرار دارد. اختصاصی بودن ژن‌های مقاومت برای نژادهای مختلف یک پاتوژن می‌تواند به وسیله دمین‌های TIR (Luck *et al*., 2000) یا LRR (Van der Hoorn *et al*., 2001) تعیین شود. در گیاه ملون همولوگ‌های ژن مقاومت گروه LRR اغلب به‌صورت خوشه‌هایی در ژنوم سازمان یافته‌اند. وقایع نوترکیبی که ژن‌های مقاومت جدیدی را می‌سازند و مقاومت را در مقابل پاتوژن‌های مختلف القا می‌کنند عمدتا شامل نوترکیبی بین ژن‌های NBS-LRR از یک خوشه می‌باشند (van Leeuwen *et al*., 2005Meyers *et al*., 2003).

بر اساس توالی‌یابی نتاج جمعیت F2 چهار کانتیگ شامل کانتیگ *MRGH21* (با هشت ژن)، کانتیگ *MRGH63* (با سه ژن)، کانتیگ های *MRGH7* و *MRGH18* هر یک با یک ژن، در ملون شناسایی شده‌است (van Leeuwen *et al*., 2005). تمرکز ژن‌های R و وجود توالی‌های تکرارشونده در این گروه‌های لینکاژی توالی‌یابی کامل را با مشکل روبرو ساخته است و روش‌های خاصی برای توالی یابی این مناطق به‌کارگرفته شده است (González *et al*., 2014).

با این حال تلاش‌های مداوم و متعددی برای توالی‌یابی ژنوم کامل ملون و تفسیر آن گزارش شده است (Castanera *et al*., Garcia-Mas *et al*., 2012, Ruggieri *et al*., 2018;2020). آخرین نسخه منتشرشده آن نسخه شماره ۱۰۲ است که از تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲ در ابزار مرورگر ژنومی در پایگاه NCBI با شماره بازیابی GCF_025177605.1 در دسترس قرار گرفته است. همچنین بطور موازی داده‌های ژنومی ملون در پایگاه آرشیو نوکلئوتیدی اروپا (ENA) با شماره بازیابی PRJEB34181 از طریق پایگاه داده‌های ملانومیکس (www.melonomics.net) قابل دسترس است.

تکمیل داده‌های ژنومی ملون مکان‌یابی ژن‌های مقاومت را امکان‌پذیر ساخته است. در گروه لینکاژی ژن *MRGH21* نُه ژن حامل دمین‌های کارکردی NBS-LRR قرار گرفته است که دو ژن مقاومت (*Fom-1* و *Prv*) به‌ترتیب مسئول مقاومت به نژادهای صفر و ۲ قارچ *F. oxysporium* f.sp. *melonis* و ویروس Papaya Ring-Spot Virus (PRSV) را نیز شامل می‌شوند. مطالعات نشان داده است بعضی از ژن‌ها در این گروه لینکاژی بیان متمایزی در ارقام ملون مقاوم به بیماری باکتریایی Fruit Blotch (BFB) نشان می دهند (Islam *et al.*, 2020). این گروه لینکاژی روی کروموزوم Chr9 ملون حدفاصل دو ژن *MRGH12* و *MRGH13* قرار گرفته است. جهش‌های نقطه‌ای در توالی این ژن‌ها در مطالعات صورت گرفته روی گونه‌های مختلف ملون گزارش شده است (Morata & Puigdomènech, 2017). همچنین میان ارقام مختلف ملون از نظر الگوی حضور و عدم حضور بعضی از ژن‌های R تفاوت‌هایی مشاهده شده است (González *et al.*, 2014). از این رو ردیابی این ژن‌ها در تعدادی از این واریته‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای حضور ژن *MRGH21* در واریته محلی خربزه ایرانی به نام خاتونی گزارش شده است (Abbaspour & Shokouhifar, 2012b). به‌نظر می‌رسد ردیابی و بررسی توالی این ژن‌ها در واریته‌های مقاوم و حساس، می‌تواند در تمایز و شناسایی جهش‌های مرتبط با مقاومت به بیماری فوزاریوم در ملون مورد توجه قرار گیرد.

مطالعه حاضر با هدف توصیف ارقام مقاوم ملون، دارای سطح مقاومتی مختلف در برابر قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی انجام شد. در این مطالعه توصیف صفات ظاهری ارقام ملون با سطوح مقاومتی مختلف و ردیابی دو ژن *MRGH* از گروه لینکاژی *MRGH21* انجام شد و امکان تعیین ژن‌های مناسب برای انجام گزینش مبتنی بر ژن‌های مقاومت مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

بذور پنج رقم افتراقی ملون به نام‌های ‘Charentais T’، ‘Charentais Fom1’، ‘Charentais Fom2’ و ‘BG-5384’ مربوط به دسته cantalupensis (Chikh-Rouhou *et al.*, 2008, Oumouloud *et al.*, 2013) (اهداء شده توسط پروفسور جی. ام. آلوارز از مرکز سیتا از اسپانیا) و رقم محلی ‘خاتونی‘ (اهدائی دکتر علی رضا سبحانی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی) نگهداری شده در بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد.

### کشت و ارزیابی صفات ظاهری ارقام ملون

ضدعفونی بذور بر اساس روش چنارانی و همکاران (Chenarani *et al.*, 2012) انجام شد. بر این اساس ابتدا پوست بذور حذف شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. آبشویی بذرها سه بار جمعاً به‌مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل و تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار فلو انجام شد. سپس بذور استریل در زیر هود داخل تشتک‌های پتری دارای کاغذ صافی مرطوب استریل قرار داده شده و به‌مدت سه روز در دمای اتاق نگه‌داری شدند. با توجه به محدودیت تعداد بذر در اختیار، از هر رقم تعداد ۵ بذر برای مرحله ضد عفونی و جوانه‌زنی استفاده شد و از میان آن سه بذر جوانه دار شده جهت کشت انتخاب شد. بذور جوانه‌زده به درون گلدان‌های ۷ لیتری با دهانه ۲۲ سانتی‌متری حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۲ اتوکلاو شده و شستشو شده با آب مقطر استریل، کشت شدند. گلدان‌ها در ابتدای فروردین ماه به گلخانه با شرایط دمایی ۱۶ تا ۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت حدود ۶۰ درصد منتقل گردیدند. در طول دوره رشد گیاهان با محلول آبیاری زیستا (شرکت زیست تروند آرین، ایران) تغذیه شدند.

صفات مختلف گیاه از جمله شکل برگ، گل‌های نر، گل‌های ماده و گل‌های نرماده، و پس از چیدن میوه‌ها وزن میوه، قطر و طول میوه، قطر گوشت و حفره میانی، طول و عرض بذور اندازه‌گیری و ثبت شد. در خصوص شکل برگ تعداد لوپ ها و عمق آن‌ها در برگ‌های کاملاً توسعه یافته (پنجمین برگ از انتهای ساقه) بصورت مشاهده‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. در خصوص گل‌ها صرفا به قابلیت تولید انواع گل ها از نظر جنسیت و از نظر تعداد گلبرگ توجه شد (Ajuru & Okoli, 2013). تمایز ارقام مقاوم و حساس بر اساس صفات ظاهری ارزیابی شده مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی‌که توصیف ارقام ملون در تمایز آن‌ها ضروری است، شناسایی صفات متمایزکننده ارقام در انتخاب نتاج حاصل از تلاقی کاربرد خواهد داشت. با توجه به تنوع بالای اندام‌های رویشی و زایشی در زیر گونه‌های ملون در این مطالعه، پنج رقم استاندارد ملون از نظر صفات رویشی و زایشی مورد مقایسه قرار گرفتند. صفات ظاهری هر رقم از سه گیاه و حداقل سه نمونه از هر گیاه یادداشت‌برداری شد. در خصوص صفات کیفی مانند شکل برگ و ویژگی‌های گل‌ها صرفا بصورت مشاهده‌ای داده‌های مورد مقایسه قرار گرفتند. در خصوص صفات کمی مانند میوه و بذر یادداشت‌برداری‌ها در تکرارهای حداقل سه‌تایی انجام شد و برای هر دسته از داده‌ها بطور مستقل معیارهای مرکزی (میانگین) و پراکنش (Error Bar) محاسبه و بصورت جدول ارائه شد.

## آنالیز داده‌های ژنومی ملون و مکان‌یابی ژن‌های *MRGH*

توالی ژن‌های *MRGH* بر اساس داده‌های گزارش شده (Oumouloud *et al.*, 2015) در توالی ژنومی رفرنس ملون با شماره بازیابی GCF_025177605.1 نسخه annotated شماره ۱۰۲ آزاد شده در تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲ ردیابی شد و توالی در برگیرنده ژن‌های *MRGH12* و *MRGH13* قرار گرفته در گروه‌های پیوسته مرتبط به مقاومت به بیماری‌ها بر اساس گزارش‌های قبلی (Garcia-Mas *et al.*, 2001, van Leeuwen *et al.*, 2005, Abbaspour & Shokouhifar, 2012b) از بانک ژن استحصال شد. همچنین توالی گروه لینکاژی *MRGH21* با ردیابی توالی دو ژن *MRGH12* و *MRGH13* در داده‌های ژنومی ارائه شده در پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics) نیز ردیابی و توالی کامل این گروه لینکاژی استحصال شد. انطباق دو توالی در نرم افزار SnapGene V5.2 انجام و اطلاعات کامل مناطق کدکننده شامل اگزون‌ها اینترون‌ها روی نسخه نهایی توالی در این نرم‌افزار تکمیل شد. جهش‌های نقطه‌ای گزارش‌شده در محدوده ژن‌های *MRGH12* و *MRGH13* در مرورگر ژنومی ملون در پایگاه MELONOMICS بررسی شد. آغازگرهای اختصاصی برای این ژن ها با استفاده از نرم‌افزار SnapGene V 5.2 طراحی شد. آغازگرهای اختصاصی PSh21-F (5’-ATG ACT CGA CTT CCC GAA CCG AA-3’) و PSh21-R (5’-TTG GCC ATC TCT CTG GAT GGC AT-3’) برای ردیابی ژن *MRGH13* و آغازگرهای اختصاصی PSh27-F (5’- TTC TCC TGC AAG GAC ACC AAG CC -3’) و PSh27-R (5’- GCT CTG AGG CGA CAA GGC ATC AT -3’) برای ردیابی ژن *MRGH12* بر اساس گزارش‌های قبلی (Abbaspour & Shokouhifar, 2012a) مورد استفاده قرار گرفت.

## استخراج DNA

نمونه‌برداری برگ‌های جوان در مراحل پنج برگی از سه بوته مربوط به هر رقم انجام شد و برگ های هر قم با یکدیگر پودر و جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های برگی تهیه‌شده با استفاده از هاون چینی و با استفاده از ازت مایع پودر گردیدند. استخراج DNA با استفاده از روش D & D انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). کمیّت و کیفیّت DNAی استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

## انجام PCR

جهت تکثیر توالی هدف، در واکنش‌های جداگانه مقدار ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی در حجم واکنش ۱۰ میکرولیتری حاوی ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۴۰۰ میکرومولار dNTPs (Parstous) و یک میکرولیتر بافر 10X PCR (Parstous)، ۵ پیکومول از هر یک از آغازگرها (ساخته‌شده توسط Macrogene, South Korea)، یک واحد آنزیم تک پلیمراز (GeNetBio, South Korea) اضافه شد و برنامه حرارتی پس از بهینه کردن به‌صورت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سلیسیوس و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلیسیوس، ۳۰ ثانیه در ۶۱ درجه سلیسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس) و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (Eppendorf, Co. Germany) انجام گردید. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ درصد از رنگ Green viewer (Parstous) الکتروفورز گردید و تصویر الگوی باندی تکثیرشده از نمونه با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد.

## آنالیز نرم‌افزاری توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13*

توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* در ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro) آنالیز شد. خانواده پروتئینی مربوط به پروتئین MRGH13 تعیین شد. دمین‌های کارکردی و توالی‌های کدکننده آن‌ها تعیین‌شده و روی توالی استحصال‌شده در نرم‌افزار SnapGene منطبق گردیدند. فرآیندهای زیستی مرتبط با این پروتئین با استفاده از ابزار تحت شبکه پایگاه QuickGO (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/)، در مرکز بیوانفورماتیک اروپا[1] (EMBL-EBI)، (https://www.ebi.ac.uk/interpro) بررسی شدند.

# نتایج

## توصیف صفات ظاهری ارقام ملون

در شکل ظاهری سطح برگ ارقام ملون مورد مطالعه تفاوت مشاهده شد (شکل ۱). در رقم ‘Charentais T’ در مقایسه با دیگر ارقام چهار فرورفتگی عمیق تر نسبت به سایرین در حاشیه برگ قابل مشاهده است که این رقم را از ارقام دیگر متمایز می‌نماید. در مقابل در رقم ‘Charentais Fom2’ چهار فرورفتگی سطحی است شکل برگ در دو رقم ‘Charentais Fom1’ و ‘BG-5384’ حد واسط ارقام قبلی است. در نیمی از برگ شیارهای حاشیه باریک و نسبتا فرورفته و نیم دیگر برگ فرورفتگی به‌صورت انحناء و سطحی بود. در رقم خاتونی برگ‌ها واجد راس مشخص، نوک‌تیز و مثلثی بوده و فرورفتگی‌های سطحی آن از سایر ارقام کمتر می‌باشد (شکل ۱).

1- The European Bioinformatics Institute




**شکل ۱- شکل برگ و فرم لوپ‌ها در پنج رقم ملون مورد مطالعه (به‌ترتیب از راست به چپ شامل رقم محلی به نام 'Khatooni'، و ارقام استاندارد ملون با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* به نام‌های 'BG-5384'، 'Charentais Fom2'، 'Charentais Fom1' و 'Charentais T' می‌باشند)**

**Figure 1- The leaf shape and lopes form in the five studied melon cultivars (fom left to right: 'Khatooni', 'BG-5384', 'Charentais Fom2', 'Charentais Fom1'and 'Charentais T', respectively)**

بر اساس کلید مشخصات برگ در ارقام ملون (IPGRI, 2003) می توان شکل برگ را در رقم خاتونی از نوع برگ کامل (Entire)، در رقم BG-5384 شکل برگ در گروه برگ کامل (Entire) با شیارهای کم عمق (shallow) قرار می‌گیرد. برگ‌های رقم Charentais Fom1 شکل برگ حدواسط برگ کامل (Entire) و پنج لوپ (Pentalobate) قرار می‌گیرند که شیارهای کم عمق (shallow) در آن دیده می‌شود. در ارقام Charentais T و Charentais Fom2 از نوع پنج لوپ (Pentalobate) که به‌ترتیب دارای شیارهای عمیق (deep leaf lobes) و شیارهای متوسط (Intermediate leaf lobes) دسته‌بندی می‌شوند. مشاهدات نشان داد در رقم Charentais T برگ‌ها به وضوح چندبخشی هستند. در مواردی که فرورفتگی عمیقی در حاشیه برگ وجود داشته باشد اصطلاحا برگ را چندبخشی (Lobed) می‌نامند. در مرکبات از شکل نوک برگ جهت تایید تلاقی‌ها و نتاج هیبرید استفاده شده است (Traband *et al.*, 2023). در ملون نیز می‌توان از صفات ظاهری مانند شکل برگ و میوه در تمایز تنوع ژنتیکی و ارقام استفاده نمود (Stepansky *et al.*, 1999).

این نتایج نشان داد بر اساس فرورفتگی‌های حاشیه برگ می‌توان ارقام ملون مورد ارزیابی در این مطالعه را از یکدیگر متمایز نمود. برگ‌های چهار رقم استاندارد مورد مطالعه همگی به دسته کانتالوپنسیس مربوط می‌شوند. این برگ‌ها از نظر لوپ‌ها و فرورفتگی حاشیه برگ با یکدیگر متمایز هستند. رقم خاتونی تنها رقم مربوط به دسته اندوروس (inodorus) است که در این مطالعه مورد بررسی بوده است، برگ این رقم فاقد لوپ و فررفتگی‌های حاشیه‌ای برگ می‌باشد و بخوبی از چهار رقم دیگر قابل تمایز است. شکل برگ در توصیف تعدادی از گونه‌های ملون مورد توجه بوده است (Ajuru & Okoli, 2013). نتایج نشان داد در رقم Charentais T برگ‌ها به خوبی چندبخشی هستند. ولی در این مطالعه هم به نوع برگ و هم به برگ‌های چندبخشی جهت توصیف ارقام توجه شده است. استفاده از شکل برگ و توارث آن می‌تواند در انتخاب اولیه نتاج حاصل از تلاقی مفید باشد.

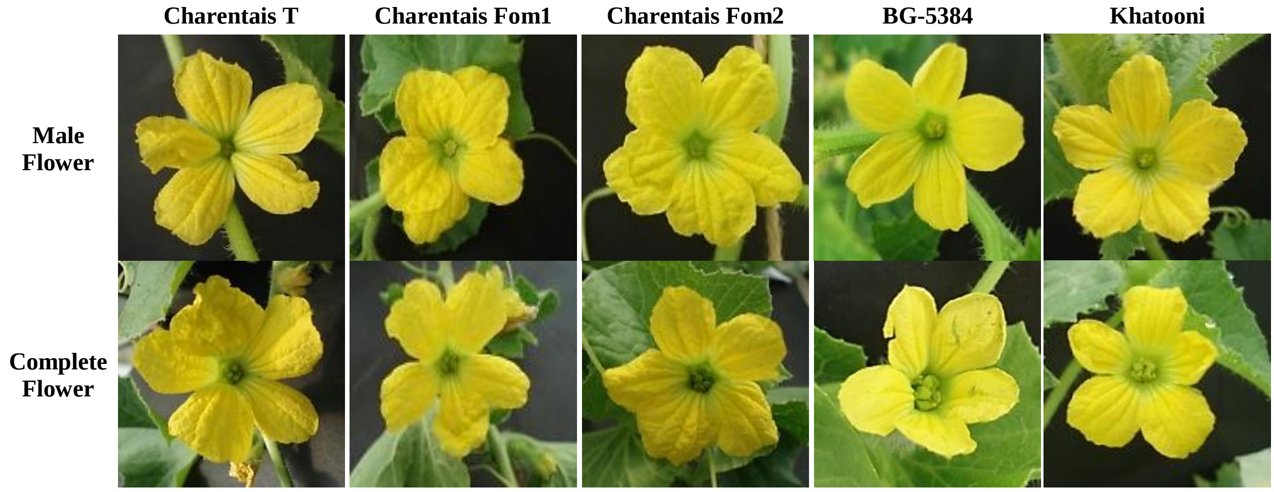
در ارقام مورد مطالعه گل نر و گل کامل مشاهده شد (شکل ۲). گلبرگ‌های زرد و کاسبرگ‌های سبز بطور مشابه به تعداد پنج عدد در ارقام تظاهر یافت. در گیاهان رشد یافته در شرایط گلخانه از نظر زمانی گل‌های نر در تمام ارقام قبل از گل‌های کامل ظاهر شدند. در ارقام Charentais Fom1 و Charentais T گل نر و گل کامل ظاهر شدند. مشاهده گل‌های متفاوت می‌تواند در برنامه اصلاحی و انجام تلاقی‌ها با اهمیت ویژه‌ای مورد توجه قرار گیرد.

آرایش گلبرگ‌ها نیز در ارقام مورد مطالعه متفاوت بود. در رقم Charentais T و BG-5384 گلبرگ‌های گل‌های نر همپوشانی نداشته و کاملا از هم مجزا بودند، در حالی‌که در رقم Charentais Fom1 و Charentais Fom2 گلبرگ‌های گل‌های نر همپوشانی داشتند (شکل ۲). در رقم خاتونی در گل‌های ماده همپوشانی گلبرگ ها در چهار رقم اندک بود. در بررسی‌های انجام‌شده روی گل‌های دیگر گونه‌های ملون تنها به بیان تعداد گلبرگ‌ها اشاره شده است و الگوی همپوشانی آن‌ها ذکر نشده است.

در رقم BG-5384 علاوه بر گل نر، گل ماده (شکل ۳-A) نیز مشاهده‌شد. در رقم Charentais Fom2 گل نر و گل ماده و علاوه بر آن گل کامل نیز مشاهده شد. تعداد گلبرگ در گل‌های نر، ماده و کامل در ارقام مختلف یکسان و پنج عدد بود. تنها در رقم Charentais Fom2 علاوه بر گل‌های نر پنج گلبرگی، تعدادی از گل‌های نر با تعداد شش گلبرگ نیز مشاهده شد (شکل ۳-B). در مطالعات مشابه دیگر نیز تعداد گلبرگ‌ها در گل‌های نر پنج عدد گزارش شده است (Ajuru & Okoli, 2013). مقایسه الگوی گل‌ها

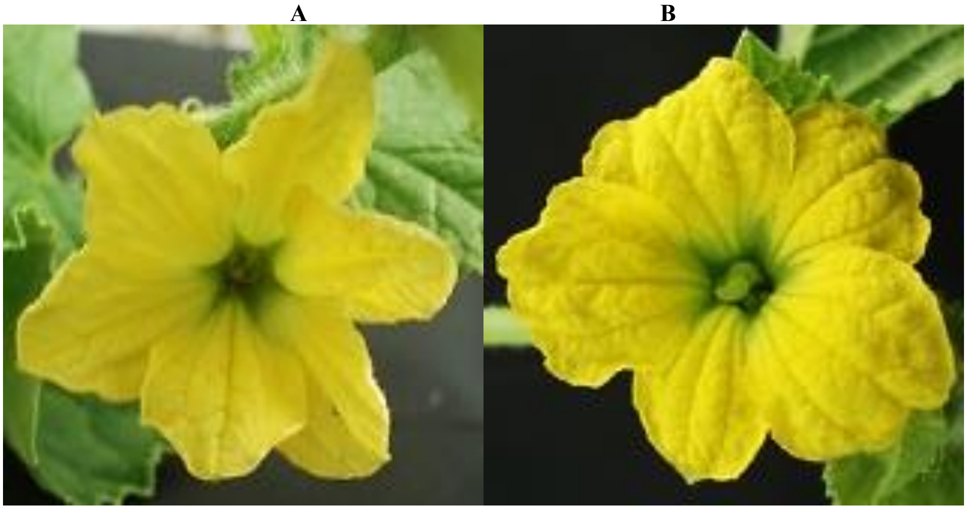
نشان می‌دهد که از نظر حضور گل‌های نر، ماده و گل کامل امکان تمایز ارقام وجود دارد.

در ارقام استاندارد مورد بررسی میوه از نوع پیو است. مشخصات و ویژگی‌های میوه در ارقام استاندارد به دو صورت کمّی و کیفی بررسی شد. از نظر کیفی، شکل میوه، رنگ پوست، نقش پوست، رنگ گوشت و شکل حفره میانی مورد توجه قرار گرفت. از نظر میوه هم ارقام با هم تفاوت داشتند (شکل ۴). در ارقام BG-5384 و خاتونی میوه بیضی شکل و در سایر ارقام کروی شکل بودند. رنگ پوست میوه در رقم BG-5384 سبز تیره است درحالی‌که در سایر ارقام سبز روشن است. در رقم خاتونی رنگ پوست زرد کمرنگ با خطوط سبز می‌باشد. نقش پوست میوه در ارقام Charentais Fom1 و Charentais Fom2 به‌صورت نواری، در رقم BG-5384 به‌صورت خطدار، در رقم Charentais T دارای لکه و در رقم خاتونی بصورت راه راه می‌باشد. رنگ گوشت میوه به‌صورت نارنجی است که در رقم BG-5384 مقداری کم‌رنگ‌تر بوده و در رقم خاتونی سبز کمرنگ می‌باشد. شکل حفره میانی در رقم BG-5384 مثلثی شکل، و در ارقام Charentais T، Charentais Fom1 و Charentais Fom2 دایره‌ای شکل بود. ویژگی‌های مختلف از جمله برخی از صفات ظاهری مربوط به رقم خاتونی در مطالعات دیگری نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Sobhani *et al.*, 2015).



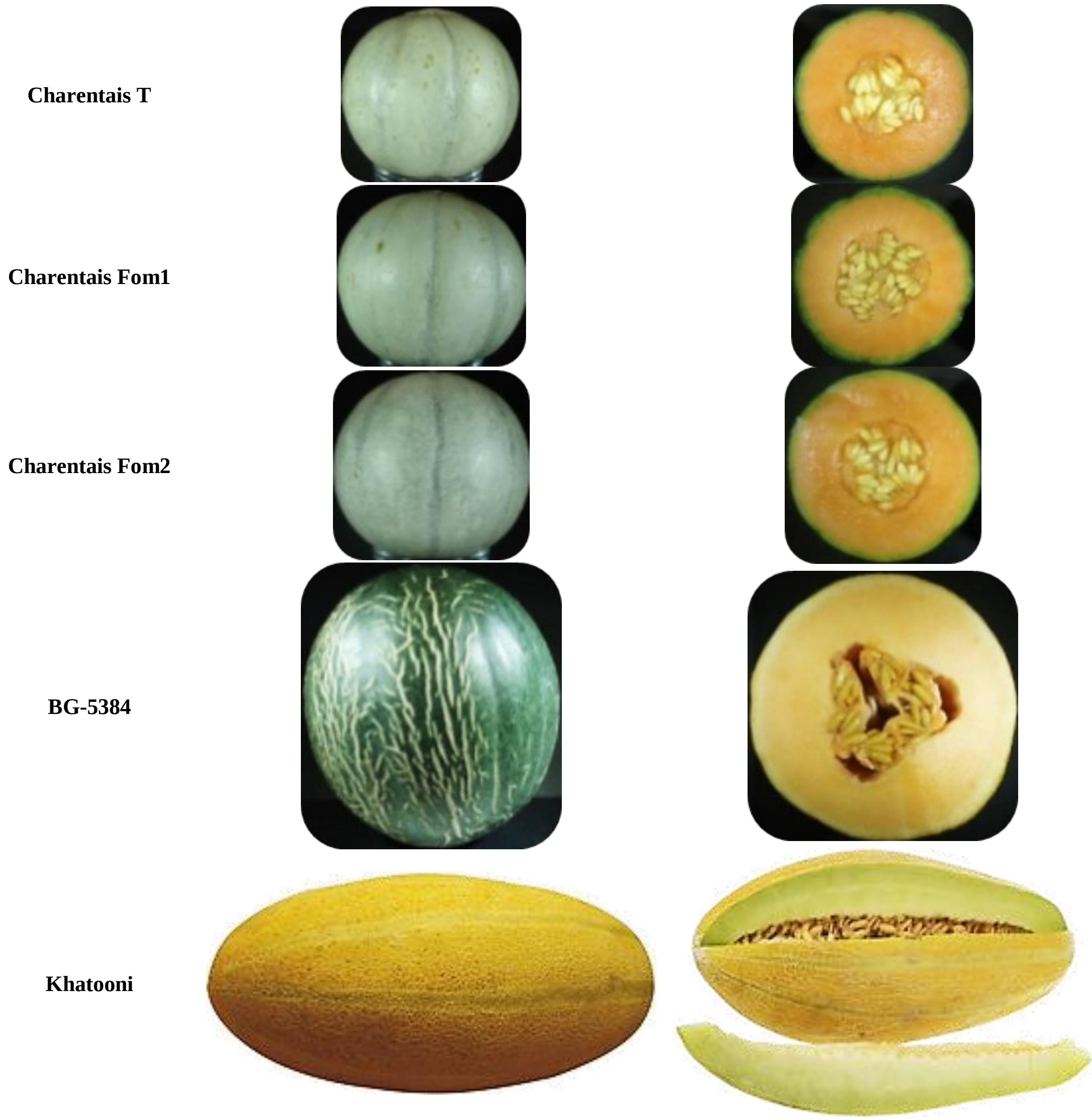

**شکل ۲- شکل گل نر (Male Flower) و گل کامل (Perfect flower) در ارقام مختلف ملون مورد مطالعه**

**Figure 2- The shape of male flower and perfrct flower in different studied melon cultivars**




**شکل ۳- گل ماده (A) و گل نر شش گلبرگی (B) در ملون رقم 'Charentais Fom2'.**

**Figure 3- Female flower (A) and six-petalled male flower (B) in melon cv. 'Charentais Fom2'**




**شکل ٤- شکل ظاهری، شبکه سطح میوه،شکل برش عرضی و طولی میوه، حفره محل بذور در ارقام استاندارد ملون حامل ژن‌های مقاومت به قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی در مقایسه با رقم محلی 'خاتونی'**

**Figure 4- The Fruits type, longitudinal and transverse diameter of fruits, fruit surface nets, seed hole shape in standard melon cultivars harboring resistance genes to Fusarium vascular wilt disease compared to the local 'Khatooni' cultivar**

صفات کمی میوه، مانند وزن، قطر میوه و حفره میانی و وزن بذور، در ارقام مورد مطالعه، متفاوت بود (جدول ۱). میوه رقم BG-5384 از نظر وزن نیز نسبت به سه رقم دیگر در رتبه بالاتری قرار داشت. در ارقام استاندارد بیشترین و کمترین طول میوه به‌طور متوسط به‌ترتیب با ۲۲/۸ سانتی‌متر در رقم BG-5384 و ۱۶/۸ سانتی‌متر در رقم Charentais Fom1 مشاهده شد. بیشترین و کمترین قطر میوه بطور متوسط به‌ترتیب ۲۱/۳ سانتی‌متر در رقم BG-5384 و ۱۷/۲ سانتی‌متر در رقم Charentais T است. رقم BG-5384 و رقم Charentais T بطور متوسط بیشترین و کمترین وزن میوه را به خود اختصاص داد. وزن میوه دو رقم Charentais Fom1 و Charentais Fom2 اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. از نظر قطر گوشت میوه سه رقم Charentais T، Charentais Fom1 و Charentais Fom2 مشابه بودند و تنها در رقم BG-5384 اندکی قطر میوه ضخیم‌تر بود. وزن ۱۰ دانه بذور در رقم BG-5384 با اختلاف حدود سه برابری از دیگر ارقام استاندارد مورد مطالعه سنگین‌تر بود (جدول ۱).

تفاوت ویژگی‌های میوه در ارقام مختلف ملون مورد ارزیابی قرار گرفته و است و تنوع بسیار بالائی در این ویژگی‌ها گزارش شده است (Soltani *et al*., 2022 ، Sobhani *et al*., 2015Ajuru & Okoli, 2013). در اکثر مطالعات شاخص‌های وزن هزار دانه بذر و همچنین وزن بذر هر میوه مورد ارزیابی بوده است ولی در مطالعه حاضر به‌دلیل محدودیت در بذور ارقام مورد ارزیابی و انجام مراحل کشت و پرورش گیاه در گلخانه تعداد گیاهچه‌ها و میوه‌های تولید شده بسیار محدود بود و به‌عنوان مثال وزن ۱۰ دانه بذر شمارش و به‌عنوان شاخص برای مقایسه ارقام مورد توجه قرار گرفته است.

### ردیابی ژن‌های *MRGH* در توالی ژنومی ملون

نتیجه بلاست توالی ژن‌های گروه لینکاژی *MRGH21* در ژنوم رفرنس ملون با شماره بازیابی GCF_025177605.1 نسخه شماره ۱۰۲ آزادشده در تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲ در پایگاه داده‌های ژنومی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/) نشان داد این گروه لینکاژی در محدوده ۱۶۹۲۵۹۲ باز تا ۱۸۰۹۹۵۲ باز روی قطعه ژنومی با شماره بازیابی NW_007546318.1 به طول تقریبی ۱۱۷ کیلوباز قرار گرفته‌اند. در حدفاصل ژن‌ها در این منطقه در حدود پنج منطقه توالی‌یابی نشده وجود دارد (شکل ۵). داده‌های این پایگاه نشان داد منطقه دربرگیرنده این گروه لینکاژی روی اسکافولدی قرار گرفته است که در این نسخه از ژنوم روی توالی هیچ یک از ۱۲ کروموزوم ملون مکان‌یابی نشده است.

نتایج نشان داد مطابق با گزارش‌های قبلی (Morata & Puigdomènech, 2017) توالی ژن‌های *MRGH* روی ژنوم ملون نشان داد گروه لینکاژی *MRGH21* حد فاصل دو ژن *MRGH12* و *MRGH13* قرار گرفته‌است. در این گروه لینکاژی ژن *MRGH9* نیز قرار دارد. براساس مطالعات انجام‌شده ژن *MRGH9* همان ژن *Fom-1* است (Brotman *et al*., 2013) که مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲ را سبب می‌شود (Risser & DW, 1976).

لذا با بررسی توالی ژن‌های *MRGH* روی داده‌های ژنومی ملون نسخه V4.0 ذخیره شده در پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics) اطلاعات دقیق‌تری حاصل شد (شکل ۶). در این نسخه علاوه بر اینکه این گروه لینکاژی روی کروموزوم شماره Chr09 مکان‌یابی شده بود، بسیاری از فاصله‌های خالی میان توالی این منطقه نیز تکمیل شده بود. ردیابی منطقه‌ای به طول تقریبی ۱۶۸/۹ کیلوباز در برگیرنده ژن های گروه لینکاژی *MRGH21* در این نتایج نشان داد که در حدفاصل دو ژن *MRGH12* (MELO3C022143.2.1) و *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) مجموعه از ژن‌های R مانند ژن *MRGH9* (MELO3C022146.2.1) و ژن *MRGH21* (MELO3C022148.2.1) قرار دارند.

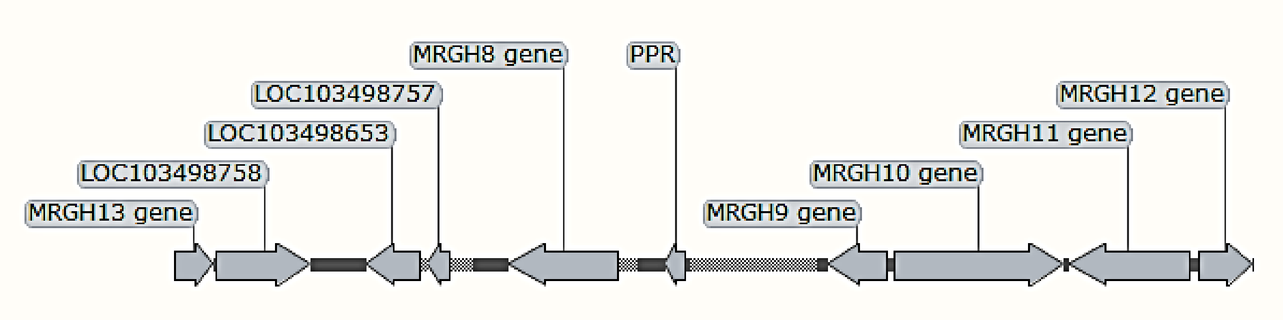
**جدول ۱- مشخصات میوه و بذر چهار رقم استاندارد ملون حامل سطوح مقاومتی مختلف در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی**

**Table 1– Fruit and seed characteristics of four standard melon cultivars with different resistance levels against Fusarium wilt disease**

| مشخصات میوه و بذر<br>Fruit and seed characteristics | ارقام ملون<br>Melon cultivars | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Charentais T | Charentais F1 | Charentais F2 | BG-5384 |
| وزن میوه<br>Fruit weight (g) | 288.5 ± 34.8 | 335.4 ± 56.1 | 361.5 ± 51.2 | 1099.3 ± 62.7 |
| قطر میوه<br>Fruit diameter (cm) | 17.2 ± 1.6 | 18.4 ± 2.7 | 19.2 ± 2.5 | 21.3 ± 3.1 |
| طول میوه<br>Fruit length (cm) | 16.8 ± 1.7 | 17.7 ± 2.7 | 18.5 ± 2.5 | 22.8 ± 3.3 |
| ضخامت گوشت میوه<br>Flesh thickness (cm) | 6.5 ± 0.8 | 6.8 ± 1.2 | 7 ± 1.1 | 7.7 ± 1.4 |
| قطر حفره<br>Fruit cavity diameter (cm) | 4.2 ± 0.2 | 4.8 ± 0.3 | 5.2 ± 0.3 | 5.6 ± 0.4 |
| وزن ۱۰ عدد بذر<br>Weight of 10 seeds (g) | 1.3 ± 0.02 | 1.6 ± 0.3 | 1.5 ± 0.02 | 4.1 ± 0.05 |

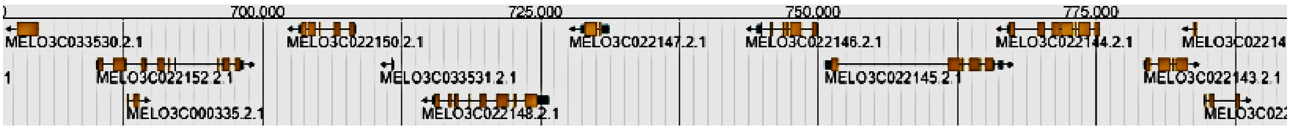
* متوسط داده‌های مربوط به سه تکرار بعلاوه و منهای خطای استاندارد میانگین هر سه داده ارائه شده است.

*Average data of three replicates ± the standard error of the average of all three data are presented.




**شکل ۵- توالی محدوده ۱۶۹۲۵۹۲ تا ۱۸۰۹۹۵۲ بازی روی قطعه ژنومی با شماره بازیابی NW_007546318.1 به طول تقریبی ۱۱۷ کیلوباز دربرگیرنده ژن‌های گروه لینکاژی *MRGH21* روی ژنوم رفرنس ملون با شماره بازیابی GCF_025177605.1 نسخه شماره ۱۰۲ آزاد شده در تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲**

**Figure 5- The sequence range of 1692592 to 1809952 bp on the genomic fragment with the retrieval number of NW_007546318.1 and an approximate length of 117 kb including *MRGH21* linkage group genes on the Melon reference genome with the retrieval number of GCF_025177605.1 version number 102 released on October 13, 2022**




**شکل ٦- محدوده ٦٨٦٨٨٣ تا ٧٨٣٥٨٠ بازی از کروموزوم شماره Ch09 ملون استحصال‌شده از داده‌های ژنومی ملون نسخه V4.0**

**Figure 6- The sequence range of 686883 to 783580 bp from chromosome number Ch09 of Melon, retrieved from Melon genomic data version V4.0**

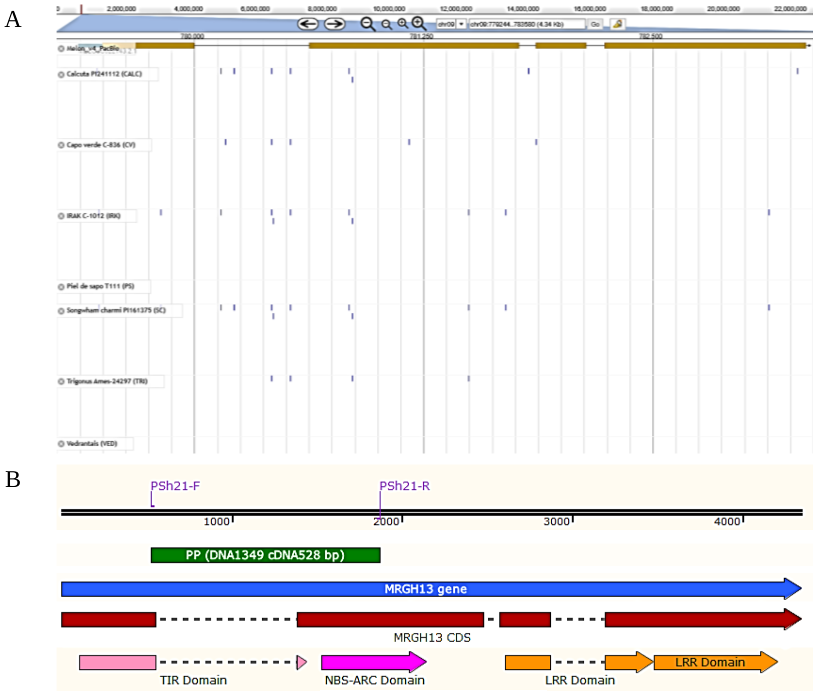
### ژن *MRGH13*

بررسی داده‌های موجود در بانک ژن و داده‌های ژنومی ملون در پایگاه NCBI در خصوص ژن *MRGH13* با شماره بازیابی LOC107991675 نشان داد که طول این ژن ۳۶۵۴ جفت باز است که در محدوده ۲۶۴۳ تا ۳۵۴۹ به طول ۹۰۷ جفت باز توالی آن نامشخص است و برای آن سه ناحیه اگزونی در محدوده‌های ۱-۵۴۲، ۱۳۸۲-۲۴۷۴ و ۳۶۳۷-۳۶۵۴ معرفی شده است. درحالی‌که بررسی داده‌های به‌دست آمده از پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics)، نشان داد ژن *MRGH13* به طول ۴۳۴۴ جفت باز (بدون در نظر گرفتن توالی‌های تنظیمی و غیر ترجمه‌شونده بالادست و پائین‌دست آن) در محدوده نوکلئوتیدهای ۷۷۹۲۴۴ تا ۷۸۳۵۸۰ روی کروموزوم Chr09 قرار گرفته‌است (شکل ۷-A). در این داده چهار ناحیه اگزونی توسط توالی های اینترونی از یکدیگر جدا شده‌اند و در محدوده‌های ۱-۵۴۲، ۱۳۸۲-۲۴۸۲، ۲۵۷۲-۲۸۷۷ و ۳۱۹۶-۴۳۴۴ به‌ترتیب به طول‌های ۵۶۱، ۱۱۰۱، ۳۰۶ و ۱۱۴۶ جفت باز در این ژن پیش‌بینی شده است که در مجموع توالی کدکننده آن به طول ۳۱۱۴ نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۷-B).

مقایسه توالی این ژن در ارقام مختلف ملون به شناسایی جهش های مختلفی در نواحی اگزونی و اینترونی منتج شده است که در داده‌های ژنومی در پایگاه MELONOMICS قابل مشاهده است (شکل ۷-A). بر این اساس انتظار می‌رود ردیابی این ژن در ارقام ملون با سطوح مقاومتی مختلف در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی نیز بتواند به تمایز این ارقام کمک نماید.

### ردیابی توالی ژن *MRGH13* در ارقام استاندارد ملون

الگوی الکتروفورزی DNAی استخراج شده از ارقام مورد مطالعه کیفیّت و کمّیت مناسبی نشان داد (شکل ۸-A) نتایج ردیابی ژن *MRGH13* در ارقام ملون دارای سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* نشان داد که آغازگرهای طراحی‌شده قادرند تک باند اختصاصی را در اندازه مورد انتظار در برخی از ارقام ردیابی نمایند. در الگوی الکتروفورزی ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 تک باند در محدود میان دو باند ۱ kb و ۱/۵ kb مشاهده شد در حالی‌که این باند در ارقام Charentais T و Charentais Fom2 با جفت آغازگر اختصاصی PSh21-F/R قابل ردیابی نبود (شکل ۸-B).

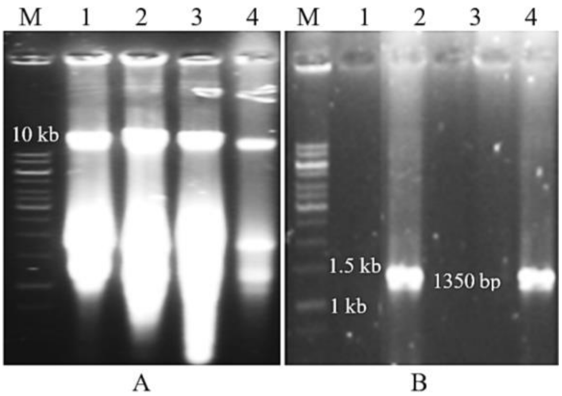



**شکل ۷- (A) نمای شماتیک موقعیت ژن *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) در محدوده ۷۷۹۲۴٤ تا ۷۸۳۵۵۰ و اندازه ٤/۳٤ کیلوباز روی کروموزوم شماره Chr09 در واریته‌های مختلف ملون رسم‌شده با مرورگر ژنومی ملون (https://www.melonomics.net/melonomics.html#/jbrowse)**

نقاط آبی‌رنگ نشان‌دهنده جهش‌های نقطه‌ای شناسایی‌شده در محدوده ژنومی در واریته مختلف ملون هستند. (B) نمای شماتیک ژن *MRGH13* نشان‌دهنده موقعیت اگزون‌ها و جایگاه اتصال آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده، قطعه قابل‌تکثیر از محتوی ژنومی ارقام ملون و جایگاه دمین‌های شناسایی‌شده با آنالیز توالی پروتئین در ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) را نشان می‌دهند.

**Figure 7- (A) Schematic representation of *MRGH13* gene position (MELO3C000335.2.1) in the sequence range of 779244 to 783550 and size of 4.34 kb on the chromosome number Chr09 in different varieties of melon drawn with Melon Genome Browser (https://www. melonomics.net/melonomics.html#/jbrowse)**

The blue dots represent point mutations identified in the genomic range of different melon varieties. (B) Schematic representation of *MRGH13* gene showing the position of exons, the annealing site of the designed specific primers, the amplifiable fragment of the genomic content of melon cultivars and the location of domains identified by protein sequence analysis in the InterPro web tool. https://www.ebi.ac.uk/interpro/).




**شکل ۸- (A) الگوی الکتروفورزی DNA ی استخراج‌شده از ارقام ملون، (B) محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی PSh21-F/R. ۱، ۲، ۳ و ٤ به ترتیب ارقام ملون ‘Charentais T’، ‘Charentais Fom1’، ‘Charentais Fom2’ و ‘BG-5384’ می‌باشند. M نشانگر یک کیلوبازی DNA می‌باشد.**

**Figure 8- (A) DNA electrophoresis pattern extracted from melon cultivars, (B) Amplified PCR product with PSh21-F/R specific primers. 1, 2, 3 and 4 are melon cultivars ‘Charentais T’, ‘Charentais Fom1’, ‘Charentais Fom2’ and ‘BG-5384’, respectively. M represents 1kb DNA size marker.**

## توالی و دمین‌های کارکردی پروتئینی کدشونده توسط ژن *MRGH13*

ساختار ژن *MRGH13* پیش‌بینی‌شده بر اساس آنالیز داده‌های به‌دست آمده از پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics)، نشان می‌دهد که این ژن می‌تواند پروتئینی به طول ۱۰۳۸ اسیدآمینه را کد نماید (شکل ۷–B). آنالیز توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* در ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) نشان داد این پروتئین عضو خانواده پروتئین‌های مقاومت گیاهی[1] (IPR044974) حامل توالی های تکراری غنی از لوسین[2] (PTHR11017) می‌باشد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت حضور دمین‌های TIR، NB-ARC و LRR در آن تأیید شد (شکل ۹).

دمین TIR (IPR000157) یک دمین سیتوپلاسمی محافظت شده به شمار می‌رود که حدوداً از ۲۰۰ اسیدآمینه تشکیل شده است. همان‌گونه که در شکل ۷–B نشان داده شده است، جایگاه این دمین در طول پروتئین MRGH13 در محدوده موقعیت اسیدآمینه‌های ۳۶ تا ۲۰۸ قرار گرفته است و توسط اگزون‌های اول و دوم کد می‌شود. دمین NB-ARC (IPR002182) یک موتیف دخیل در انتقال پیام-های دفاعی در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها است که در پروتئین‌های دخیل در مقاومت گیاهان به بیمارگرها نیز مشاهده شده‌است. جایگاه این دمین در طول پروتئین MRGH13 در محدوده موقعیت اسیدآمینه‌های ۲۳۶ تا ۴۴۳ قرار گرفته‌است و توسط اگزون شماره دو کد می‌شود.

حضور دو نسخه از دمین LRR (IPR013210) در طول پروتئین MRGH13 پیش‌بینی شده است که نسخه اول آن در محدوده موقعیت اسیدآمینه‌های ۵۶۷ تا ۷۵۲، و نسخه دوم آن در محدوده اسیدآمینه‌های ۷۵۳ تا ۹۹۴ قرار گرفته است. نسخه اول به وسیله اگزون سوم و چهارم و نسخه دوم به‌طور کامل به‌وسیله بخش انتهایی اگزون چهارم کد می‌شود.

## پیش‌بینی فرآیندهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13

یافتن روابط میان فعالیت‌های مختلف سلولی می‌تواند در شناسایی فرآیندهای سلولی و مدل‌سازی آن‌ها تأثیر به‌سزایی ایفا نماید. ابزار تحت شبکه QuickGO ارائه‌شده توسط مرکز بیوانفورماتیک اروپا[3] (EMBL-EBI)، ابزاری سریع برای مرور هستی‌شناسی ژن‌ها و بررسی کارکردهای پروتئین محصول یک ژن به شمار می‌رود (Consortium, 2015). نتیجه بررسی توالی پروتئین MRGH13 در ابزار QuickGO نشان داد که این پروتئین می‌تواند نقش انتقال پیام (GO0007165) را در فرآیندهای زیستی ایفاء نماید (شکل ۱۰). این پیام می‌تواند در ایجاد تغییر در فعالیت و یا وضعیت یک سلول مؤثر باشد. انتقال پیام با دریافت آن توسط گیرنده‌ها مثل ارتباط لیگاند به گیرنده، انجام می‌شود و با تنظیم یک فرآیند سلولی مانند تنظیم رونویسی از دسته‌ای از ژن ها و یا تنظیم یک فرآیند متابولیک در پائین دست خاتمه می‌یابد. نتایج بدست‌آمده از آنالیز GO نشان می دهد که پروتئین MRGH13 با کارکرد خود می‌تواند در فرآیندهای متعدد سلولی نقش داشته باشد. همان‌گونه که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود عملکرد این پروتئین می‌تواند بخشی از فرآیندهای تبادل اطلاعات بین‌سلولی (GO:0007154)، پیام رسانی (GO:0023052) و پاسخ‌دهی سلولی به محرک‌ها (GO:0051716)، به شمار آید.

از جمله مسیرهای زیر شاخه انتقال پیام مرتبط با کارکرد زیستی این پروتئین می‌توان به مسیر پیام‌رسانی تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی[4] (GO:0002764)، مسیرهای پیام‌رسانی مبتنی بر سالیسیلیک‌اسید[5] (GO:0009863) و مسیر پیام‌رسانی مرگ نکروزشدگی[6] (GO:0097527) اشاره کرد.

## بحث

دست‌یابی به نشانگرهای مناسب جهت تمایز ارقام ملون مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌تواند پیشبرد برنامه‌های اصلاحی را با دقت و سرعت بالاتری تقویت نماید. در این مطالعه با بررسی صفات مختلف ظاهری از جمله شکل برگ، گل‌های نر، ماده و نرماده، و پس از چیدن میوه‌ها، وزن میوه، قطر و طول میوه ، قطر گوشت و حفره میانی، سایز طولی و عرضی بذور در ارقام استاندارد ملون به نام‌های Charentais T، Charentais Fom1، Charentais Fom2 و BG-5384 که دارای سطوح مقاومتی متفاوتی در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی هستند، امکان تمایز این ارقام را از یکدیگر مهیا نمود. از این صفات ظاهری در تعدادی از مطالعات جهت تمایز ارقام ملون استفاده شده‌است (Ajuru & Okoli, 2013). نتایج مطالعه حاضر نشان داد براساس صفاتی ظاهری مورد مطالعه مانند شکل برگ، حضور گل کامل، تعداد گلبرگ‌ها، می‌توان اختلافاتی بین ارقام مورد مطالعه مشاهده نمود، ولی نکته قابل‌توجه این است که در برنامه‌های گزینشی دست‌یابی به این صفات ظاهری با توجه به تعداد زیاد نمونه

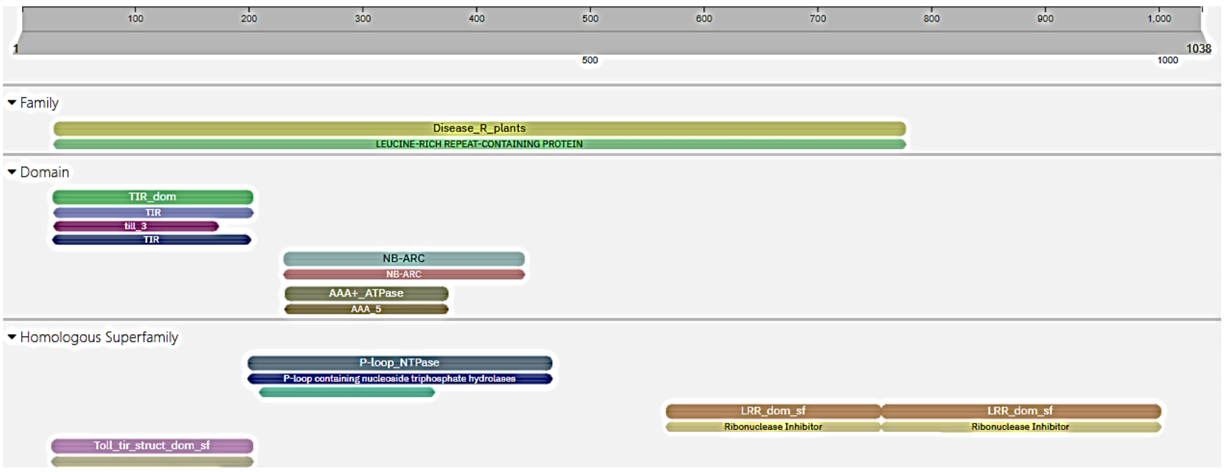
1- Disease resistance protein
2- Leucine-Rich Repeat-Containing Protein
3- The European Bioinformatics Institute

4- Immune Response-Regulating Signaling Pathway
5- Salicylic Acid Mediated Signaling Pathway
6- Necroptotic Signaling Pathway

های مورد بررسی کاری بسیار زمان‌بر و هزینه‌بر خواهد بود و در صورت دراختیار بودن نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفت مقاومت انتظار می‌رود راندمان برنامه‌های اصلاحی بطور چشمگیری افزایش یابد.

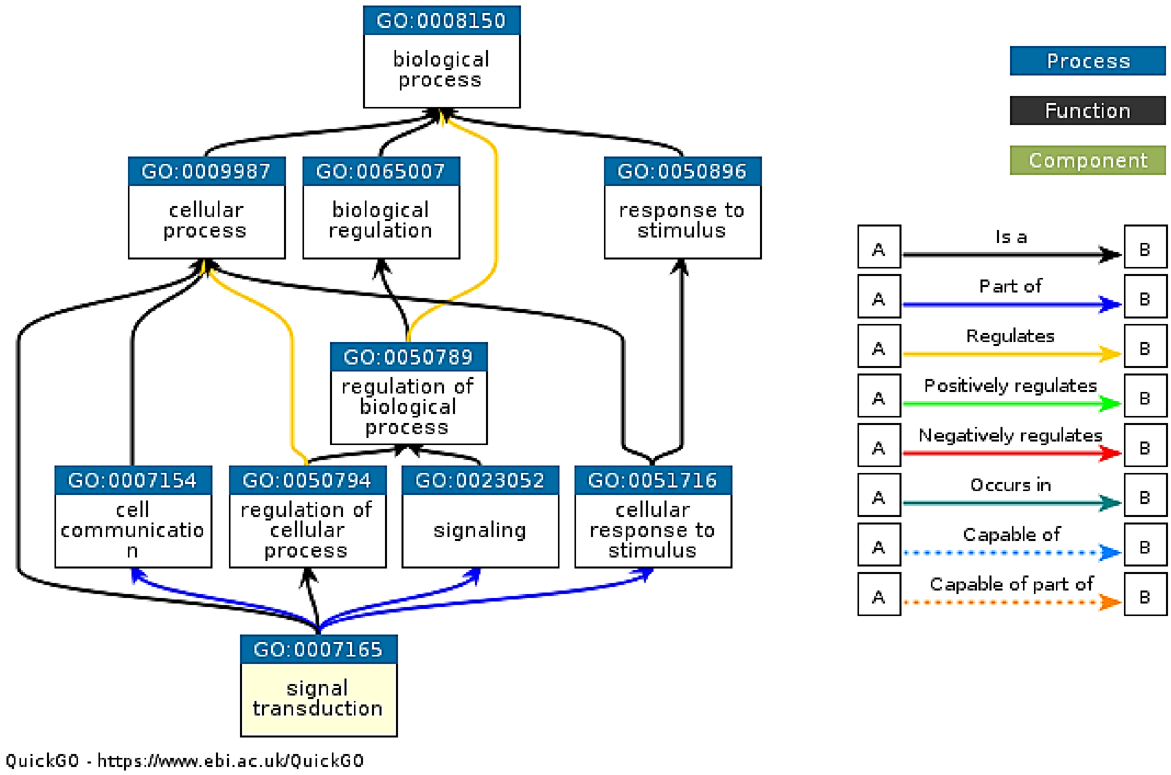
ردیابی ژن‌های مقاومت *MRGH* و گروه‌های لینکاژی آن‌ها در ژنوم ملون با توجه به داده‌های انبوه زیستی فراهم شده و همچنین در اختیار بودن توالی ژنومی تقریبا کامل این گیاه، می‌تواند در شناسایی نشانگرهای مولکولی مناسب مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه حاضر گروه لینکاژی *MRGH21* حامل تعدادی از ژن‌های مقاومت از جمله ژن مقاومت *FOM1* در داده‌های ژنومی ملون شناسایی شد و با مقایسه داده‌های ارائه‌شده در بانک ژن محدوده قرارگیری این گروه لینکاژی با شماره بازیابی NW_007546318.1 روی آخرین نسخه توالی آزادشده در پایگاه NCBI مکان‌یابی شد. بررسی داده‌های ژنومی در پایگاه MELONOMICS نشان داد این گروه لینکاژی روی کروموزوم شماره Chr09 حدفاصل دو ژن *MRGH12* (MELO3C022143.2.1) و *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) قرار دارد. براساس توالی کامل به‌دست آمده از این پایگاه و با توجه به جهش‌های متنوع گزارش‌شده در توالی ژن *MRGH13* در ارقام مختلف ملون بررسی روی توالی این ژن متمرکز شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی این ژن در ارقام ملون موردمطالعه انجام شد و آنالیزهای صورت‌گرفته نشان داد با استفاده از یک جفت آغازگر می‌توان با دقت بسیار بالایی ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 را از دو رقم Charentais T و Charentais Fom2 متمایز نمود.

الگوی مقاومتی ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 در برابر نژادهای قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* نشان می‌دهد این دو رقم هر دو در برابر نژاد R2 مقاوم هستند (Alvarez *et al*., 2005). انتظار می‌رود مطابق با گزارش‌های صورت‌گرفته (Zink & Thomas, 1990; Zheng & Wolff, 2000) عامل ژنتیکی مقاومت در برابر نژادهای R۱ و R۲ در این قارچ در ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 به‌دلیل حضور ژن *Fom2* باشد. با این‌حال حضور ژن *Fom2* در ارقام مختلف از جمله ارقام استاندارد مقاوم و حساس گزارش شده است. هرچند جهش‌هایی در ژن *Fom2* میان ارقام مقاوم و حساس گزارش شده است ولی میان الگوی حضور جهش‌ها و الگوی مقاومت ارقام انطباق مشاهده نشده است (Shokouhifar *et al*., 2016). با توجه به تنوع بالای ارقام ملون، تاکنون تعداد زیادی از ژن‌های دارای ساختارهای مشابه ژن‌های مقاومت شناسایی و گزارش شده است (Garcia-Mas *et al*., 2012). این گزارش‌ها این احتمال را مطرح می‌نماید که ژن‌های دیگری نیز می‌تواند در برهمکنش میان ارقام ملون و نژادهای مختلف قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* و بروز الگوی مقاومتی آن مؤثر باشد. بررسی‌های صورت‌گرفته روی ۳۱۴ ژن R کلون‌شده نشان داده است که ۹ سازوکار مختلف با توجه به دمین‌های کارکردی مختلف، توسط این ژن‌ها جهت القاء و یا تقویت سامانه‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها شناسایی شده است (Kourelis & van der Hoorn, 2018). گزارش ژن مقاومت منفرد و غالب *Fom-3* از کولتیوار Perlita-FR (Zink, 1985) که در بروز مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲ مؤثر است می‌تواند این احتمال را تقویت نماید.




**شکل ۹- نتیجه آنالیز توالی پروتئین MRGH13 به وسیله ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) نشان‌دهنده خانواده ژنی، دمین‌های شناسایی‌شده، بزرگ خانواده‌های پروتئینی مشابه و دمین‌های معرف این خانواده ها می‌باشد.**

**Figure 9- The result of MRGH13 protein sequence analysis using the InterPro web tool (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) showing the gene family, identified domains, large similar protein families and domains represent these families.**




**شکل ۱۰- فرآیند زیستی پیش‌بینی‌شده برای پروتئین MRGH13 براساس نتیجه بررسی صورت‌گرفته در پایگاه InterPro GO**
**(https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0007165)**

خطوط ترسیم‌شده مسیرهای اثرگذاری پروتئین را در فرآیندهای زیستی مختلف نشان می‌دهند.

**Figure 10- Predicted biological process for MRGH13 protein based on the result obtained from InterPro GO database (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0007165)**

Drawing lines show the pathways of protein involved in different biological processes.

به‌منظور بررسی بیشتر و پیش‌بینی کارکردهای پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* توالی این پروتئین در پایگاه InterPro انجام شد و نتایج تأیید نمود که این پروتئین به خانواده پروتئین‌های مقاومت حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین[1] (PTHR11017) متعلق می باشد. این خانواده پروتئین‌های گیرنده ایمنی درون سلولی را شامل می‌شوند که قادرند حضور مولکول‌های بیماری‌زا یا سیگنال‌های مشتق از میزبان را تشخیص دهند (Wang *et al.*, 2019). در گیاهان، شناسایی مستقیم یا غیرمستقیم عوامل بیماری‌زا توسط NLRها[2]، سبب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی متعددی از جمله مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، و یا پاسخ فوق حساسیت می‌شوند که می‌تواند توسعه پاتوژن را در گیاه تنها به همان محل شروع عفونت محدود نماید (Dangl *et al.*, 2013). پروتئین‌های NLRs میان گیاهان و جانوران مشترک هستند و به‌وسیله دمین‌های مرکزی محافظت‌شده NB و دمین الیگومرکننده (NOD)[3]، یک دمین غنی از لوسین انتهای C[4] و یک دمین متغییر در انتهای N توصیف می‌شوند (Maekawa *et al.*, 2011). در گیاهان این پروتئین‌ها بر اساس توالی انتهای N در دو گروه اصلی CC–NLRs[5] و TIR–NLRs[6] تقسیم‌بندی می‌شوند (Maekawa *et al.*, 2011).

دمین TIR در گیرنده‌های TLRs[7] و آداپتورهای آن‌ها یافت می شود. نقش آنزیمی برای این دمین در پروتئین‌های گیاهی حامل آن مشاهده شده است که می‌تواند همانند هم‌خانواده‌های خود در پروتئین های حیوانی سبب هیدرولیز +NAD شود و این فعالیت NADase برای تقویت پیام‌های ایمنی‌زایی در برابر بیمارگرها ضروری است (Wang *et al.*, 2019Bayless & Nishimura, 2020, , Horsefield *et al.*, 2019).

1- Leucine-Rich Repeat-Containing Protein
2- Nucleotide-binding (NB) Leucine-rich repeat (LRR) Receptor

3- Oligomerization Domain
4- C-terminal LRR domain
5- Coiled coil (CC)–NLRs
6 - Toll Interleukin-1 Receptor (TIR)–NLRs
7- Toll-Like Receptors

دمین NB-ARC در پروتئین‌های حامل ان در سلوی‌های جانوری مرگ سلولی را تنظیم می‌کند (van der Biezen & Jones, 1998). بررسی‌های ساختاری این دمین در یک پروتئین آپوپتوز انسانی به نام (Apaf-1[1]) نشان داده‌است که این دمین حامل سه لایه از پیچش‌های α-β است که به یک منطقه چرخش α منتهی می‌شود که از ویژگی خانواده بزرگ دمین‌های AAA+ ATPase به شمار می‌رود. این دمین قابلیت باندشدن با ATP را دارا می‌باشد. پیش‌بینی شده است که اتصال ATP توسط این دمین و هیدرولیز آن توسط دمین TIR می‌تواند به بروز تغییرات ساختاری منتج شود. این تغییرات می‌توانند به شکل‌گیری آپوتوز در نتیجه دریافت سیگنال منتهی شود (Riedl *et al*., 2005). دمین LRR در انتهای C پروتئین‌های NLR گیاهی قرار گرفته است و از تکرارهای غنی از لوسین از ۲ تا ۴۵ موتیف ۲۰ تا ۳۰ اسیدآمینه‌ای تشکیل شده‌اند که به شکل یک کمان یا نعل اسب آرایش می‌گیرند (Enkhbayar *et al*., 2004). این مجموعه یک چهارچوب ساختاری را برای شکل‌گیری برهمکنش پروتئین‌ها فراهم می‌نماید (Enkhbayar *et al*., 2004).

آنالیز فرآیندهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13 احتمال ارتباط این پروتئین با چندین مسیر پیام‌رسانی مرتبط با مسیرهای دفاعی را در گیاه نشان داد. یکی از این مسیرها، مسیر پیام‌رسانی تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی[2] با شماره بازیابی (GO:0002764) است. این مسیر یک فرآیند آبشاری به شمار می‌رود که با برهمکنش یک عامل با گیرنده آغاز می‌شود و تغییراتی را در سطح فعالیت یک RNA پیام‌رسان یا اهداف پائین دست دیگری را سبب می‌شود و سرانجام به فعال‌سازی، تداوم و یا مهار یک پاسخ ایمنی در گیاه منتج می‌شود (Lanier, 2005). مسیر پیام‌رسانی مبتنی بر سالیسیلیک‌اسید (SA)[3] (GO:0009863) یکی دیگر از مسیرهای مرتبط با پروتئین MRGH13 معرفی شده است. هورمون SA یک هورمون کلیدی در ایمنی ذاتی گیاه[4] شامل مقاومت موضعی و سیستمی در برابر حملات عوامل زیستی و پاسخ‌های فوق‌حساسیت و مرگ سلولی به شمار می رود (Ding & Ding, 2020). این دو مسیر کاملا با کارکرد پیش-بینی شده برای پروتئین MRGH13 منطبق است و با کارکرد دمین-های مشخص‌شده در این پروتئین در ارتباط است.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه با بررسی تعدادی از صفات ظاهری ارقام استاندارد ملون با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی، توصیف ظاهری کاملی از این ارقام به‌دست آمد. به‌منظور دست‌یابی به نشانگرهای مولکولی جهت گزینش منابع مقاومت به بیماری‌ها منطقه در برگیرنده گروه لینکاژی حامل ژن‌های *MRGH21* در داده های ژنومی انجام شد و با استفاده از ردیابی ژن *MRGH13* با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی امکان تمایز ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 با حضور یک تک باند مهیا شد.

آنالیز توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* نشان داد این پروتئین به‌عنوان عضوی از خانواده پروتئینی حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین دربرگیرنده دمین‌های TIR، NB-ARC و LRR می‌باشد که کارکردهای مرتبط با مسیر دفاعی گیاهی نشان می‌دهند. بررسی مسیرهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13 نیز نشان داد که این پروتئین می‌تواند در مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی گیاه دخیل باشد. با توجه به نقش پیام‌رسانی این پروتئین، انجام مطالعات آتی برای شناسایی برهمکنش آن با دیگر پروتئین‌های ملون می‌تواند در شناخت نقش آن در مقاومت مؤثر باشد.

## سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و مدیریت پژوهشکده علوم گیاهی برای مهیا نمودن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در انجام این پژوهش سپاسگزاری نمایند. ضمناً بودجه انجام این تحقیق از محل اعتبار اختصاص‌یافته به طرح شماره ۱۸۹۴۸ توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است.

1- Protease-activating factor 1
2- Immune Response-Regulating Signaling Pathway
3- Salicylic Acid Mediated Signaling Pathway
4- Plant Innate Immunity

## References


1. Abbaspour, N., & Shokouhifar, F. (2012a). *Detection of resistance gene homologous in number of melon cultivars*. In: 12th Iraninan Genetics Congeres. university of Shahid Beheshti international Hall, Tehran: Iranian Genetics Society, 1-6.
2. Abbaspour, N., & Shokouhifar, F. (2012b). *Detection, amplification and sequencing of a part of the MRGH21 gene in Khatuni melon*. In: Third National Conference on Agricultural Biotechnology.
3. Ajuru, M.G., & Okoli, B.E. (2013). The morphological characterization of the melon species in the family cucurbitaceae Juss., and their utilization in Nigeria. *International Journal of Modern Botany*, *3*, 15-19. https://doi/10.5923/j.ijmb.20130302.01
4. Alvarez, J.M., González-Torres, R., Mallor, C., & Gómez-Guillamón, M.L. (2005). Potential sources of resistance to Fusarium wilt and powdery mildew in melons. *HortScience, 40*, 1657-1660. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.6.1657
5. Armstrong, G., & Armstrong, J. (1978). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of the cucurbitaceae. https://doi.org/10.1094/phyto-68-19
6. Bayless, A.M., & Nishimura, M.T. (2020). Enzymatic functions for Toll/interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system. *Frontiers in Genetics, 11*, 539. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00539
7. Benoit, F. (1974). The Fusarium problem in melon growing in Belgium and the relative value of certain rootstocks. *Tuinbouwerichten (Belgium), 38*, 16-20.
8. Brotman, Y., Normantovich, M., Goldenberg, Z., Zvirin, Z., Kovalski, I., Stovbun, N., Doniger, T., Bolger, A.M., Troadec, C., Bendahmane, A., & Cohen, R. (2013). Dual resistance of melon to *Fusarium oxysporum* races 0 and 2 and to Papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented NB-LRR genes of unusual architecture. *Molecular Plant*, *6*, 235-238. https://doi.org/10.1093/mp/ssr096
9. Castanera, R., Ruggieri, V., Pujol, M., Garcia-Mas, J., & Casacuberta, J. M. (2020). An improved melon reference genome with single-molecule sequencing uncovers a recent burst of transposable elements with potential impact on genes. *Frontiers in Plant Science, 10*, 1815. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01815
10. Chenarani, Z., Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Farrokhi, N. (2012). *Study the effects of explant and medium types in direct regeneration induction in melon (Cucumis melo L., cv. Khatooni).* In: 12th Iranian Genetics Congress. Tehran.
11. Chikh-Rouhou, H., Álvarez, J., & González-Torres, R. (2007). Differential interaction between melon cultivars and race 1.2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, *72*, 825-829.
12. Chikh-Rouhou, H., González-Torres, R., Alvarez, J.M., & Oumouloud, A. (2010). Screening and morphological characterization of melons for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2. *HortScience, 45*, 1021-1025. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.7.1021
13. Chikh-Rouhou, H., González Torres, R., Alvarez, J., & Pitrat, M. (2008). Characterization of the resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in *Cucumis melo* 'BG-5384. In Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France).
14. Chilosi, G., Reda, R., Aleandri, M.P., Camele, I., Altieri, L., Montuschi, C., Languasco, L., Rossi, V., Agosteo, G.E., Macrì, C., & Carlucci, A. (2008). Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. *EPPO Bulletin, 38*, 147-154. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01200.x
15. Chupp, C. (1930). Fusarium wilt of muskmelon. *Plant Dissese Report, 14*, 160.
16. Consortium, G.O. (2015). Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic Acids Research*, *43*, D1049-D1056. https://doi.org/10.1093/nar/gku1179
17. Dangl, J.L., Horvath, D.M., & Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, *341*, 746-751. https://doi.org/10.1126/science.1236011
18. Deokar, A., Sagi, M., & Tar'an, B. (2019). Genome-wide SNP discovery for development of high-density genetic map and QTL mapping of ascochyta blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *132*, 1861-1872. https://doi.org/10.1007/s00122-019-03322-3
19. Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in Plant Science*, *25*, 549-565. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004
20. Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochemical Bulletin, 19(1)*, 11-15.
21. Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., & Matsushima, N. (2004). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *54*, 394-403. https://doi.org/10.1002/prot.20144
22. Food and agriculture organization of the United Nations, FAO. (2017). FAOSTAT database. FAO-ESS Rome, Italy. http://www.fao.org/faostat

23. Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V.M., Hénaff, E., Câmara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., & Alioto, T. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*, 11872-11877. https://doi.org/10.1073/pnas.12054151
24. Garcia-Mas, J., van Leeuwen, H., Monfort, A., de Vicente, M.C., Puigdomènech, P., & Arus, P. (2001). Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon. *Plant Science*, *161*, 165-172. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00403-4
25. González, V.M., Aventín, N., Centeno, E., & Puigdomènech, P. (2014). Interspecific and intraspecific gene variability in a 1-Mb region containing the highest density of NBS-LRR genes found in the melon genome. *BMC Genomics*, *15*, 1131. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1131
26. Herman, R., & Perl-Treves, R. (2007). Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in *Cucumis melo*. *Plant Disease*, *91*(9), 1180-1186. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1180
27. Horsefield, S., Burdett, H., Zhang, X., Manik, M.K., Shi, Y., Chen, J., Qi, T., Gilley, J., Lai, J.S., Rank, M.X., & Casey, L.W. (2019). NAD+ cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways. *Science*, *365*, 793-799. https://doi.org/10.1126/science.aax1911
28. IPGRI, (International Plant Genetic Resources Institute). (2003). Descriptors for melon (*Cucumis melo* L.). Rome, Italy.
29. Islam, M.R., Hossain, M.R., Jesse, D.M.I., Jung, H.J., Kim, H.T., Park, J.I., & Nou, I.S. (2020) Characterization, identification and expression profiling of genome-wide R-genes in melon and their putative roles in bacterial fruit blotch resistance. *BMC genetics*, *21*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s12863-020-00885-9
30. Jiang, G.-L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, *3*, 45-83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0_15
31. Joobeur, T., King, J.J., Nolin, S.J., Thomas, C.E., & Dean, R.A. (2004). The fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal*, *39*, 283-297. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02134.x
32. Kantoğlu, K.Y., Seçer, E., Erzurum, K., Tutluer, İ., Kunter, B., Peşkircioğlu, H., & Sağel, Z. (2010). Improving tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in melon using tissue culture and mutation techniques. kurumsalarsiv.tenmak.gov.tr
33. Kourelis, J., & van der Hoorn, R.A.L. (2018). Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*, *30*, 285-299. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579
34. Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*, *23*, 225-274. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
35. Leach, J. (1933). A destructive Fusarium wilt of muskmelon. *Journal of Agriculture Research*, *23*, 556-559.
36. Leary, J., JV, L., & WD, W. (1976). Identification of the races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing wilt of muskmelon in California. https://doi.org/10.1094/phyto-66-15
37. Lian, Q., Fu, Q., Xu, Y., Hu, Z., Zheng, J., Zhang, A., He, Y., Wang, C., Xu, C., Chen, B., & Garcia-Mas, J. (2021). QTLs and candidate genes analyses for fruit size under domestication and differentiation in melon (*Cucumis melo* L.) based on high resolution maps. *BMC Plant Biology*, *21*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s12870-021-02904-y
38. Luck, J.E., Lawrence, G.J., Dodds, P.N., Shepherd, K.W., & Ellis, J.G. (2000). Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *The Plant Cell*, *12*, 1367-1377. https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1367
39. Maekawa, T., Kufer, T.A., & Schulze-Lefert, P. (2011). NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology*, *12*, 817-826. https://doi.org/10.1038/ni.2083
40. Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR–encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *15*, 809-834. https://doi.org/10.1105/tpc.009308
41. Miccolis, V., & Saltveit, M.E. (1991). Morphological and physiological changes during fruit growth and maturation of seven melon cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *116*, 1025-1029. https://doi.org/10.21273/jashs.116.6.1025
42. Monforte, A., Garcia-Mas, J., & Arús, P. (2003). Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding*, *122*, 153-157. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00848.x
43. Morata, J., & Puigdomènech, P. (2017). Variability among Cucurbitaceae species (melon, cucumber and watermelon) in a genomic region containing a cluster of NBS-LRR genes. *BMC Genomics*, *18*, 138. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3529-5
44. Oumouloud, A., El Otmani, M., & Álvarez, J. (2015). Molecular characterization of Fom-1 gene and development of functional markers for molecular breeding of resistance to Fusarium race 2 in melon. *Euphytica*, *205*, 491-501. https://doi.org/10.1007/s10681-015-1420-5

45. Oumouloud, A., Torres, R.G., Garcés-Claver, A., Chikh-Rouhou, H., & Alvarez, J. (2013). Differential response of *Cucumis melo* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 isolates. *Crop protection, 44*, 91-94. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.001
46. Pitrat, M. (2008) Melon. In: *Vegetables I.* Springer, pp. 283-315. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_9
47. Quiot, J., JB, Q., & KG, S. (1979). Fréquence des principales viroses identifiées dans une exploitation maraîchère du Sud-Est de la France.
48. Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R., & Shi, Y. (2005). Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature, 434*, 926-933. https://doi.org/10.1038/nature03465
49. Risser, G., & DW, D. (1976) A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f .sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. https://doi.org/10.1094/phyto-66-1105
50. Ruggieri, V., Alexiou, K.G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., & Benhamed, M. (2018). An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports*, 8 8088. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26416-2
51. Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Khyrabad, M.M. (2016). Tracking of the gene Fom2 and study on the genetic diversity of NB-ARC domain in the number of resistant and sensitive melon cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (race 1). *Australasian Plant Pathology, 45*, 279-288. https://doi.org/10.1007/s13313-016-0408-5
52. Singh, R., Kumar, K., Purayannur, S., & Verma, P. K. (2023). Genomics-assisted genetics of complex regions from chickpea chromosome 4 reveals two candidate genes for Ascochyta blight resistance. *Plant Science, 334*, 111781. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111781
53. Sobhani, A., Bashteni, E., Rafezi, R., Heidarpour, A., & Gharib, M. (2015). Khatooni 93, a new melon cultivar suitable for cultivation in temperate warm areas of Iran. *Research Achivments for Field and Horticulture Crops, 4*, 117-126. https://doi.org/10.22092/rafhc.2016.109501
54. Soltani, F., Shajari, M., Mirbehbahani, G.S., & Bihamta, M.R. (2022). Assessment of melon genetic diversity based on fruit phenotypic traits and flowering habits. *International Journal of Horticultural Science and Technology, 9*, 97-116. https://doi.org/10.22059/ijhst.2021.313939.415
55. Stepansky, A., Kovalski, I., & Perl-Treves, R. (1999). Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution, 217*, 313-332. https://doi.org/10.1007/bf00984373
56. Sudheesh, S., Kahrood, H.V., Braich, S., Dron, N., Hobson, K., Cogan, N.O., & Kaur, S. (2021). Application of genomics approaches for the improvement in ascochyta blight resistance in chickpea. *Agronomy, 11*, 1937. https://doi.org/10.3390/agronomy11101937
57. Szamosi, C., Solmaz, I., Sari, N., & Bársony, C. (2010). Morphological evaluation and comparison of Hungarian and Turkish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. *Scientia Horticulturae, 124*, 170-182. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.024
58. Teimouri, S., Rahnama, K., Hajian Shahri, M., & Afzali, H. (2013). Identification, distribution and pathogenicity of Fusarium species isolated from root and crown of cantaloupe and melon in Khorasan Razavi province (In Persian), 35-46.
59. Traband, R.C., Wang, X., Lui, J., Yu, L., Hiraoka, Y., Herniter, I.A., Bowman, C., Resendiz, M., Wang, Z., Knowles, S.P., & Lo, S. (2023). Exploring the phylogenetic relationship among citrus through leaf shape traits: A morphological study on citrus leaves. *Horticulturae, 9*, 793. https://doi.org/10.3390/horticulturae9070793
60. Udoh, L.I., Obaseojei, W.P., & Uzoebo, C. (2021). Single nucleotide polymorphisms: a modern tool to screen plants for desirable traits. In: *Plant Breeding-current and Future Views.* https://doi.org/10.5772/intechopen.94935
61. van der Biezen, E.A., & Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology, 8*, R226-R228. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70145-9
62. Van der Hoorn, R.A., Kruijt, M., Roth, R., Brandwagt, B.F., Joosten, M.H., & De Wit, P.J. (2001). Intragenic recombination generated two distinct Cf genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*, 10493-10498. https://doi.org/10.1073/pnas.181241798
63. van Leeuwen, H., Garcia-Mas, J., Coca, M., Puigdoménech, P., & Monfort, A. (2005). Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. *Molecular Genetics and Genomics, 273*, 240-251. https://doi.org/10.1007/s00438-004-1104-7
64. Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Wang, H.W., & Zhou, J.M. (2019). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, 364, eaav5868. https://doi.org/10.1126/science.aav5868
65. Zheng, X., & Wolff, D. W. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA markers linked to fusarium wilt resistance in diverse melons. *HortScience, 35*, 716-721. https://doi.org/10.21273/hortsci.35.4.716

66. Zink, F. (1985). Inheritance of resistance in muskmelon to Fusarium wilt. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *110*, 600-604. https://doi.org/10.21273/jashs.110.5.600
67. Zink, F., & Thomas, C. (1990). Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0, 1 and 2 in muskmelon line MR-1. *Phytopathology, 80*, 1230-1232. https://doi.org/10.1094/phyto-80-1230